**СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

**Препаративная ВЭЖХ**

К настоящему времени не создан единый вариант метода препаративной ВЭЖХ, который обладал бы как большой скоростью и эффективностью разделения, так и высокой производительностью и экономичностью. Поэтому предложены варианты метода, значительно различающиеся по размерам и эффективности колонок, по производительности работы, требованиям к оборудованию и затратам на оборудование, сорбенты и растворители. При выборе оптимального варианта препаративной ВЭЖХ для каждой конкретной задачи. Исследователю приходится сталкиваться с рядом трудностей и проблем.

Первой и основной трудностью является высокая стоимость узко сепаративных сорбентов, особенно привитых, с размером частиц от 5 до 20 мкм. Если с этим можно мириться для аналитических колонок диаметром 2–5 мм, то стоимость резко растет при использовании колонок диаметром 10, 20 или 40 мм и может составить соответственно 200, 800 и 3200 рублей (без учета стоимости металлических колонок и работы по их заполнению). Кроме того, такие колонки достаточно непросто заполнять суспензионным способом.

Вторая трудность–создание хроматографов, насосы которых могли бы подавать растворитель при давлениях 5–20 МПа при расходе 5–100 мл/мин, а инжекторы позволяли бы водить без размывания пробы объемом 0,5–10 мл. Для таких насосов необходимы довольно мощные, дорогостоящие и тяжелые электродвигатели, сложные и дорогие уплотнения, клапаны и т.д.

Третья трудность–необходимость расходования больших объемов растворителей высокой чистоты, что приводит к большим затратам труда и времени на их регенерацию и очистку или к большим тратам на их приобретение. Расход растворителя достигает 10 л и более на 1 г препаративно выделенного очищенного продукта.

Наконец, существуют проблемы, связанные с ограниченной растворимостью образца в растворителе, повышенной вязкостью концентрированных растворов, взрыво- и пожароопасностью работы, необходимостью удаления больших объемов растворителей под вакуумом и т.д.

Конечно, все эти трудности возрастают по мере роста масштаба работы и количества вещества, которое нужно препаративно выделить или очистить. Отсюда первое правило: масштаб препаративного разделения должен быть мал настолько, насколько позволяют поставленные задачи.

Многие проблемы, связанные с выделением 1–10 мг чистых веществ для их идентификации современными высокочувствительными физико-химическими методами легко разрешаются на обычных аналитических колонках диаметром 4–5 мм путем многократного ввода проб и сбора фракций. Как правило, для таких работ не требуется никакого специального оборудования, кроме обычного аналитического хроматографа, а сбор фракций осуществляется вручную. Производительность работы можно увеличить без существенного изменения аппаратуры, заменив аналитическую колонку на препаративную диаметром 10–14 мм: как правило, насосы способны подавать до 5–10 мл/мин растворителя, а инжекторы–вводить 0,1–1 мл пробы. Правда, стоимость оборудования увеличивается на стоимость такой колонки, однако и производительность работы возрастет в 4–10 раз. Дальнейшего увеличения количества выделяемого вещества можно добиться уже только при значительном усложнении и удорожании оборудования.

Так, разделить большие количества на аналитическом хроматографе с колонкой диаметром 10–14 мм можно при увеличении продолжительности его работы, чего можно достигнуть путем автоматизации процесса ввода и сбора образца. Для этого хроматограф должен быть оснащен коллектором фракций, автоматическим устройством ввода пробы и компьютером, управляющим их работой. Для некоторых жидкостных насосов предусмотрена возможность установки специальных препаративных головок, иногда с рециклом разделенных фракций, позволяющих использовать эти насосы с колонками диаметром 20–25 мм (при производительности до 20–30 мл/мин) или 35–50 мм (до 100 мл/мин). Соответственно петлевой инжектор должен иметь достаточно широкие внутренние каналы и возможность установки петли размером до 10 мл. Конструкция и геометрия петли должны быть такими, чтобы обеспечивалось минимальное размывание образца при вводе пробы: длинные петли малого диаметра без резких изменений геометрии потока предпочтительней коротких и большого диаметра. Нередко удается заметно улучшить разделение, одновременно уменьшив размывание образца при вводе пробы путем ввода пробы без инжектора, установив вместо него тройник малого Ир объема и вводя пробу вспомогательным насосом высокого ржавления, работающим короткий отрезок времени. Менее удобным способом, дающим сходный результат, является ввод больших проб на колонку шприцем с использованием инжектора с прокалываемой резиновой мембраной, или краном малого объема, однако при этом ввод пробы (из-за ограниченного давления, которое можно создать шприцем даже хорошего качества: около 5 МПа для шприца емкостью 1 мл и около 1 МПа–для шприца емкостью 10 мл) осуществляют при остановке потока (выключении основного насоса).

При использовании колонок большого диаметра (10 мм и более) особое внимание должно быть уделено выбору сорбента. Как правило, дорогие узкодисперсные сорбенты с размером частиц 5 или 10 мкм для широких колонок использовать нецелесообразно из-за высокой стоимости и трудности суспензионной упаковки. Поэтому часто идут на компромиссное решение и используют препаративную фракцию того же сорбента с размером частиц 25–40 мкм или 40–70 мкм, которая выпускается рядом фирм специально для этих целей. Преимуществом такого сорбента является возможность упаковки сухим способом в колонки большого диаметра, более низкая стоимость (в 3–6 раз дешевле) при полном сохранении химической природы поверхности и пористости сорбента, используемого в аналитическом варианте. Кроме того, при работе с более крупным сорбентом требуется значительно меньшее давление, что упрощает работу и позволяет использовать более дешевое оборудование.

Выпускают также сорбенты для препаративной работы с размером частиц 15–25 мкм. Колонки, заполненные такими сорбентами суспензионным методом, имеют высокую эффективность. При использовании непривитого силикагеля, колонок очень большого диаметра (более 20 мм) и при необходимости очистки или выделения очень больших количеств вещества нередко практикуется применение дешевого и доступного сорбента. Часто используют силикагель для ТСХ (фракция 5–40 мкм), который нередко фракционируют седиментацией для сужения фракционного состава (отделяют пылевидные частицы, заметно повышающие гидравлическое сопротивление колонки, и наиболее крупные). Нередко применяют наиболее мелкую фракцию (40–70 мкм), имеющуюся в продаже для колоночной хроматографии. Однако переход на сорбент с другим размером и распределением пор и с несколько другими химическими свойствами поверхности может привести к заметному изменению разделения, удерживания, а иногда даже и порядка выхода разделяемых компонентов. Такие же изменения наблюдаются и при переходе от привитого сорбента одной фирмы к препаративному сорбенту другой фирмы.

Количество образца, которое можно ввести на колонку для препаративного разделения, зависит от многих факторов, и для каждого случая должно определяться экспериментально, предпочтительно с использованием аналитической колонки и растворов образца разной концентрации. В самом общем виде можно сказать, что масса образца, которую можно ввести, составляет от 0,1 до 1 мг на 1 г сорбента при отсутствии заметной перегрузки колонки пробой (снижение эффективности колонки менее чем в 2 раза). Как правило, препаративные разделения проводят при максимально возможной перегрузке колонки пробой, поэтому чем больше α для разделяемых компонентов, тем больше можно перегрузить колонку пробой и тем соответственно больше получить разделенного вещества за препаративный цикл. При разделении простых смесей, когда работают с большой перегрузкой, эффективность препаративных колонок с мелкими узкодисперсными сорбентами по основным пикам быстро падает, но по пикам примесей остается высокой, что позволяет отделять их более четко. При работе с большой перегрузкой эффективность по основным пикам для малоэффективных колонок и колонок средней и высокой эффективности близка. Однако по мере усложнения задачи (более сложные смеси, меньше α) допустимая перегрузка уменьшается и малоэффективные колонки становятся непригодными. они перестают обеспечивать разделение и получение чистых компонентов даже при отсутствии перегрузки.

Растворители, используемые для препаративной работы. должны быть, как правило, перегнанными, профильтрованными и не содержать примесей, так как в процессе выделения образца из фракции упариванием его концентрация (и концентрация примесей, остающихся в нем от недостаточно чистого растворителя) увеличивается в 200–1000 раз. Смена растворителя в препаративной ВЭЖХ с колонками большого диаметра и уравновешивание колонки с новым растворителем обычно достаточно длительны, сопровождаются большим расходом растворителей, поэтому работу надо планировать так, чтобы делать это по возможности редко. Раствор образца определенной концентрации должен быть приготовлен на основании экспериментов, выполненных на колонке с таким же сорбентом, но меньшего размера: вводят пробы растворов разной концентрации и объема и выбирают соотношение, позволяющее нагрузить колонку наибольшим количеством образца при достаточном для сбора препаративных фракций в чистом виде разделении. Раствор образца должен быть тщательно профильтрован и не содержать взвесей твердых частиц, в том числе и выпадающих в процессе его хранения до конца препаративной работы. Целесообразно для предохранения колонки от возможного загрязнения такими частицами ввести в систему фильтр малого объема между инжектором и препаративной колонкой. Нужно стараться проводить всю препаративную работу в максимально сжатые сроки, предохраняя раствор образца и собранные фракции от длительного контакта с воздухом, светом и повышенной температурой. Чем ниже температура и меньше срок хранения раствора, чем быстрее отгоняется растворитель от собранных фракций, тем чище получаются собранные вещества и легче вся дальнейшая работа с ними.

Особое место в препаративной ВЭЖХ занимает эксклюзионная хроматография макромолекул. Этот метод используют в предварительном варианте для выделения целевых веществ или их групп из смесей, содержащих компоненты с заметно

различающейся молекулярной массой. Исключительную важность этот метод имеет для очистки лабильных биополимеров. Так, на препаративных колонках с TSK-гелями SWG за один ввод можно очистить 100–200 мг ферментов. Разработана технология приготовления высокоэффективных препаративных колонок для эксклюзионной хроматографии синтетических полимеров. Это позволило решить одну из наиболее трудных проблем исследования полимеров – быстрое получение узких фракций, необходимых для исследовательских целей и для калибровки аналитических систем. Особенно важным является то обстоятельство, что этим методом можно фракционировать практически любые полимеры, в то время как классические методы фракционирования не только несоизмеримо более трудоемки, но и малопригодны для разделения многих объектов, в частности, образцов с молекулярной массой до 10 000 – 30000.

Следует отметить, что при разделении синтетических полимеров нельзя сильно перегружать колонку. За счет вязкостного эффекта наблюдается сильное смещение удерживаемых объемов, что резко ухудшает качество получаемых фракций. Тем не менее производительность процесса достаточно высока. Так, при препаративном разделении на колонке размером 250х21,5 мм с зорбаксом-сил эффективностью около 10000 т.т. при единовременном вводе 200 мг образца сополимера этилена с винилацетатом (объем дозы 8 мл, концентрация 2,5%) разделение заканчивалось за 5 мин при скорости подвижной фазы (тетрагидрофуран) 16 мл/мин. Такая скорость разделения позволила за рабочий день фракционировать 8 г сополимера даже без применения автоматического дозатора с ручным отбором фракций каждые 20 с. Характеристики полученных фракций представлены в табл. 3.1.

Эти результаты показывают, что в выбранных условиях удалось получить весьма узкие фракции сополимера с молекулярной массой более 3000. Две последние фракции асимметричны и имеют заметно большую полидисперсность за счет присутствия продуктов с более высокой молекулярной массой, сильнее адсорбирующихся на силикагеле.

Чтобы полностью избежать проявления адсорбционных эффектов, разделение нужно проводить на колонках с полужесткими гелями.

Таблица 1. Характеристики узких фракций сополимера этилена с винилацетатом

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № фракции | Мω | Мn | Mω/Mn |
| Исходный образец | 6300 | 2700 | 2,33 |
| 2 | 10700 | 9300 | 1,15 |
| 3 | 6600 | 5600 | 1,18 |
| 4 | 3600 | 2950 | 1,22 |
| 5 | 2000 | 1450 | 1,38 |
| 6 | 1650 | 800 | 2,06 |

**Микроколоночная ВЭЖХ**

Среди специалистов до настоящего времени идут споры о том, какую хроматографию следует считать микроколоночной. какую обычной аналитической, но в меньшем масштабе [57, 58]. Если жидкостная хроматография с использованием поверхностно-пористых (пелликулярных) сорбентов осуществляется на колонках диаметром около 2 мм и даже 1 мм и длиной до нескольких метров, можно ли считать ее микроколоночной ВЭЖХ или нет? Можно ли отнести к области современной микроколоночной хроматографией ранние работы с использованием заполненных микрочастицами размером 5 и 10 мкм тефлоновых колонок, эффективность которых 500 – 1500 т.т.?

Представляется целесообразным считать, что современная микроколоночная ВЭЖХ возникла около 8 лет назад и признаками ее появления в окончательно сформированном виде следует считать, во-первых, разработку технологии заполнения высокоэффективных колонок диаметром 2 и 1 мм, объемом от 50 до 800 мкл и имеющих приведенную ВЭТТ от 2 до 5, т.е. такую же, как у современных аналитических колонок, с микрочастицами размером 3, 5, 7 и 10 мкм (до 20 мкм), во-вторых, создание, разработку и серийный выпуск как специально разработанных узлов, так и хроматографов для микроколоночной ВЭЖХ. Достигнутая степень миниатюризации ВЭЖХ с колонками диаметром 1 мм уже позволила широко ввести этот метод в практику и оценить получаемые преимущества резкое снижение расхода растворителя и сорбента (в 15–25 раз), повышение чувствительности метода и снижение определяемого минимума вещества в пробе (в 15–25 раз). Это существенно ускорило внедрение жидкостной хроматографии в биологию, биотехнологию, медицину.

Проводимые работы по развитию микроколоночной ВЭЖХ, направленные на дальнейшую миниатюризацию колонок, очевидно, являются перспективными и нужными, однако их освоение и внедрение в практику в большой мере сдерживается техническими трудностями. Описаны капиллярные колонки для ВЭЖХ с внутренним диаметром около 5 и 10 мкм, в том числе и с привитыми фазами, позволившие получить эффективность до нескольких миллионов т.т.; описаны колонки с привитыми сорбентами, имеющие внутренний диаметр около 30–50 мкм, также позволившие получить эффективность около миллиона т.т. Однако ввод проб в такие колонки, особенно количественный, стабильная подача растворителей с расходом 0,01–1 мкл/мин при давлениях 10–40 МПа, наконец, создание детекторов с объемом кюветы в 1–20 нл, дающих высокую чувствительность, – все это только часть серьезных проблем, решить которые предстоит в дальнейшем. Сейчас можно предсказать, что в ближайшие 5–10 лет микроколоночные хроматографы с колонками диаметром 0,2–2 мм найдут самое широкое применение в аналитической практике, хотя и не станут наиболее массовыми.

Каковы же основные отличия аппаратуры для микроколоночной ВЭЖХ от обычной? Насос должен стабильно подавать растворитель при высоких давлениях (5–40 МПа) и небольших расходах (0,1–100 мкл/мин). Как правило, обычные насосы для ВЭЖХ либо не работают при таких параметрах, либо не обеспечивают стабильной подачи. Инжектор должен обеспечивать воспроизводимый ввод проб размером 0,1–1 мкл при высоких давлениях (до 40 МПа), что также не удается осуществить, используя старые петлевые инжекторы с петлями 10 мкл и более. Для соединения колонки с инжектором и детектором приходится идти либо на прямое соединение без использования капилляров, либо использовать капилляры с внутренним диаметром 50–150 мкм очень небольшой длины (2–5 см). Наконец, детектор должен иметь кювету очень малого объема (0,03–1 мкл), но обеспечивающую высокую чувствительность детектирования (для УФ детекторов длина оптического пути должна быть от 1 до 10 мм). Для градиентной микроколоночной ВЭЖХ дополнительно возникают трудности, связанные с микроподачей элюента в начале и конце градиента (от 1% обычного расхода для микроколонки) и созданием эффективного микросмесителя вместимостью от 1 до 20 мкл. Весьма проблематичным становится формирование градиента одним насосом и системой клапанов на стороне низкого давления, так как устройство такого типа с вместимостью 10–40 мкл (включая объемы клапанной системы, подводящих капилляров и поршневой камеры или камер насоса) очень трудно представить.

Какие основные проблемы в настоящее время существуют в микроколоночной хроматографии? Во-первых, это трудность приготовления высокоэффективных колонок с внутренним диаметром 0,5–2 мм с широким диапазоном сорбентов всех типов. Во-вторых, существует ограниченный круг детекторов с микрокюветами вместимостью 0,03–2 мкл, пригодных для работы с микроколонками, которые серийно производят в достаточно широком масштабе и по доступным ценам. Такими детекторами являются некоторые УФ-фотометры, спектрофотометры, флюоресцентные детекторы, электрохимические детекторы. Очень интересным и информативным является сочетание микроколоночной ВЭЖХ с хроматомасс-спектрометром, позволяющее существенно упростить проблему интерфейса для ряда применений, однако высокая стоимость такого детектора ограничивает его широкое применение. Разработка детекторов с лазерными источниками позволяет создать микрокюветы для рефрактометров и Других детекторов, однако стоимость таких детекторов достаточно высока. В-третьих, существуют психологические трудности и инерция производства, поддерживающие развитие традиционной ВЭЖХ и сдерживающие развитие микроколоночной.

Отечественный серийный микроколоночный хроматограф «Милихром» нашел широкое применение как в исследовательской работе, так и для контроля на производстве. Он имеет шприцевой насос вместимостью 2500 мкл, выполненный из упрочненного стекла, жидкость контактирует только с высокоинертными материалами: фторопластом, стеклом и танталом, что позволяет использовать высокоагрессивные растворители с и добавки. Насос рассчитан на давление 10 Мпа (До 1987 г. – 5 Мпа.) и диапазон подачи растворителя от 1 до 600 мкл/мин. Детектором служит сканирующий спектрофотометр с диапазоном длин волн 190 – 360 нм и временем сканирования от 0,15 с, что позволяет осуществлять сканирование в выбранном диапазоне длин волн в без остановки потока. Диапазон оптических плотностей детектора от 12,8 до 0,05 единиц адсорбции на всю шкалу в пересчете на длину оптического пути 10 мм. Микрокювета детектора имеет вместимость 1,5 мкл при длине оптического пути 1,5 мм. Оригинально выполнен узел ввода пробы: набор пробы от 0,1 мкл и более осуществляется засасыванием пробы в иглу путем регулируемого хода шагового двигателя, управляющего насосом. Игла с пробой далее уплотняется путем обжимания фторопластового конуса вплотную к верхнему фильтру колонки, и при пуске насоса проба без размывания подается через иглу в колонку; тем же путем подается растворитель, промывающий иглу и элюирующий пробу. Таким образом, ввод пробы осуществляется без использования микрошприца, при этом удается исключить ошибки, связанные с плохой промывкой шприца от предыдущей пробы и характерные для начинающего и малоопытного оператора.

В хроматографе предусмотрено использование колонок двух типов: стеклянных с внутренним диаметром 1–1,5 мм, рассчитанных на работу при давлении до 1,5 МПа и создание полностью инертной хроматографической системы, и из нержавеющей стали длиной 60 и 120 мм с внутренним диаметром 2 мм. Все соединительные линии в хроматографе выполнены из толстостенных фторопластовых капилляров, на конце имеющих развальцовку, по которой и производится уплотнение; при низком давлении используются капилляры из полиэтилена. Шприцевой насос «Милихром» имеет привод от шагового двигателя, что позволяет не только обеспечить высокую воспроизводимость времени удерживания и количества вводимой пробы, но и формировать при необходимости в камере насоса градиент растворителя заданной формы и осуществлять градиентное элюирование сложных по составу смесей веществ. Предусмотрена также работа «Милихрома» с микроколлектоPOM фракций, обеспечивающим сбор микрофракций для последующей идентификации другими физико-химическими методами.

Серийно выпускают хроматографы, предназначенные для микроколоночной ВЭЖХ, различные зарубежные фирмы. Следует отметить микроколоночный хроматограф «Фэмилик 300 С» фирмы «Джаско», имеющий трехплунжерный насос, микроинжектор вместимостью 1 и 3 мкл, спектрофотометр «Увидек 100 V» с кюветой вместимостью 1 мкл при 5 мм длины оптического пути и флюориметрический детектор с кюветой вместимостью 2 мкл. Эта фирма имеет большой опыт в производстве микроколоночных хроматографов, так как она выпустила в продажу первый микроколоночный хроматограф «Фэмилик 100» в 1976 г. Интересен микроколоночный хроматограф фирмы «Иско», имеющий шприцевой насос вместимостью 50 мл и давлением 70 МПа с подачей растворителя от 0,02 до 600 мкл/мин, микроинжектор вместимостью 0,1 мкл и спектрофотометрический детектор с кюветами разной вместимости и длины оптического пути от 0,5 мкл и 10 мм до 0,03 мкл и 1 мм. Градиентную микроколоночную систему с двумя шприцевыми насосами выпустила фирма «Броунли Лабс»; систему с двумя и тремя растворителями предлагает фирма «Хьюлетт-Пакард». Набор гибких микроколоночных хроматографов разработан фирмой «Жилсон» – от простейшего изократического с подачей растворителя от 0,5 мкл/мин при 42 МПа, с микроинжектором на 1 мкл и УФ-детектором на 254 и 280 нм с микрокюветой 1,3 мкл при 5 мм до градиентного хроматографа, имеющего в качестве детектора спектрофотометр с такой же микрокюветой или флюориметрический детектор с микрокюветой. Широкий набор спектрофотометров с микрокюветами вместимостью 0,5 мкл при 1 мм длины оптического пути выпускает фирма «Кратос»; она же выпускает флюориметрические детекторы с микрокюветами. Изократические хроматографы для микроколоночной ВЭЖХ выпускают фирмы «Шимадзу», «Кнауэр», «ЛК.Б», «Байо-Рэд», «Вариан», «Лаборатори Дэйта Контрол» и др.

Большой интерес представляет сочетание микроколоночной ВЭЖХ с масс-спектрометрией. Известно, что присутствие больших количеств растворителя в элюенте, выходящем из хроматографической колонки обычного размера (4,6 мм Х 250 мм), обусловливает создание достаточно сложного и дорогого интерфейса. Этот интерфейс предназначен для удаления растворителя и транспортировки проб в ионизационную камеру масс-спектрометра. Если сечение хроматографической колонки уменьшается, как в микроколоночной ВЭЖХ, в 25–100 раз, т.е. если используют колонки диаметром от 0,5 до 1 мм, мощности насосов масс-спектрометра хватает для удаления растворителя и поддержания высокого вакуума в ионизационной камере, и необходимость в интерфейсе отпадает. Следует отметить, однако, что еще не решен ряд проблем при прямой стыковке микроколонки и масс-спектрометра, таких, как удаление солей из элюента при использовании буферных систем растворителей, резкое снижение температуры на конце микроколонки из-за интенсивного съема тепла при испарении растворителя и др.

Большой интерес представляют и другие сочетания микроколоночной ВЭЖХ с физико-химическими методами анализа. Например, показано, что с использованием дисков из бромида калия можно записать и запомнить хроматографическую информацию, поступающую с микроколонки, и при необходимости получить ИК-спектр и другую информацию об интересующем пике или участке хроматограммы.

**ВЭЖХ с градиентом состава растворителя**

При разработке метода разделения сложных смесей веществ, особенно биологического и природного происхождения, Исследователю часто приходится сталкиваться с тем, что в их состав не только входит большое количество соединений, но и сильно различаются их свойства. Подобрать в этом случае сорбент и растворитель, которые обеспечивали бы разделение вcex или большинства интересующих исследователя компонентов, обычно не удается. Однако еще тогда, когда колонки в хроматографии были малоэффективными, было найдено и средство для решения таких задач – использование растворителя, элюирующая сила которого постепенно увеличивалась. Это приводило к тому, что как слабо, так и сильно удерживаемые вещества выходили из колонки за приемлемо короткое время, при этом зоны сильно удерживаемых соединений сужались и давали более узкие и симметричные пики. Когда эффективность колонок была повышена, популярность градиентного элюирования несколько уменьшилась, однако для многих объектов до настоящего времени это единственно приемлемый вариант – ВЭЖХ с градиентом растворителя, или градиентная ВЭЖХ (ГВЭЖХ).

С какими же проблемами сталкивается исследователь, переходя от изократической ВЭЖХ к градиентной? Проблем здесь несколько, и рассмотрение их целесообразно разделить на связанные с конструкцией прибора, с выбором колонки и с выбором растворителя для ГВЭЖХ.

Прибор для градиентной ВЭЖХ, как видно из самого определения, должен иметь устройство для изменения состава растворителя по заданной исследователем программе. Возможны два варианта такого устройства: создание градиента при низком давлении растворителей с подачей смеси в насос и соэдание градиента при высоком давлении, когда каждый из растворителей (сильный и слабый) подается своим насосом с переменной скоростью, так чтобы элюирующая сила смеси увеличивалась. В приборе для ГВЭЖХ, помимо обычных узлов, появляются дополнительно программатор (устройство формирования градиента), управляемые им система клапанов или второй насос (для градиента низкого и высокого давления соответственно), смеситель. Этим обусловлен первый недостаток ГВЭЖХ – приборы для нее примерно вдвое дороже, чем для изократической ВЭЖХ.

Нередко в состав системы для ГВЭЖХ приходится добавлять дорогое устройство для эффективной дегазации растворителей продуванием гелия, действием вакуума на растворитель, подаваемый через специальные полупроницаемые трубки и т.д. Это связано с тем, что при смешении плохо дегазированных растворителей всегда выделяются пузырьки, так как растворимость газа в смеси растворителей обычно отличается от суммы растворимостей в чистых растворителях. Это особенно опасно при градиенте низкого давления, так как пузырек газа, попавший в клапанную систему и в насос, полностью нарушает их работу. Наконец, в градиентной системе существует довольно заметный объем от места формирования градиента растворителя до места его поступления в колонку: обычно этот объем составляет от 1 до 3 мл или больше, поэтому состав растворителя, поступающего в колонку, отличается от того, который формируется в это же время. При работе на колонках малого диаметра (1–2 мм) и при небольших расходах растворителя (10–200 мкл/мин) это приводит к еще большим отличиям. Затруднительно гомогенное смешение сильного и слабого растворителей, поступающих в смеситель: недостаточно эффективное смешение и неоднородность потока вызывают заметное увеличение шумов, что мешает использовать чувствительные шкалы детектора. Наконец, при градиентном элюировании практически исключается использование рефрактометрического детектора, так как изменение показателя преломления при изменении состава растворителя приводит к нарушению его работы.

Выбор сорбента и колонки для ГВЭЖХ также имеет свои особенности. Прежде всего, колонка должна быстро приходить в равновесие с растворителем постоянно изменяющегося состава как в процессе градиентного элюирования, так и при возвращении к исходному составу растворителя при подготовке колонки к новому анализу. Если для старых колонок в жидкостной хроматографии, работавших однократно, градиент формировался и использовался один раз, после чего сорбент в колонке заменялся свежим, и это позволяло применять силикагель и оксид алюминия, то для ГВЭЖХ эти сорбенты не подходят, так как уравновешивание их со слабым растворителем после градиента слишком длительно. Однако современные обращенно-фазные и другие привитые сорбенты достаточно быстро приходят в равновесие с исходным растворителем после окончания градиентного элюирования, что позволяет успешно использовать их для этих целей. Время, необходимое для уравновешивания колонки, для каждого сорбента устанавливается экспериментально по достижению постоянства времени удерживания веществ, входящих в анализируемую смесь. Это время различно как для разных сорбентов, так и для разных по составу растворителей, и может колебаться от десятков до нескольких сотен минут.

Наконец, очень важно правильно выбрать растворитель и добавки для него при ГВЭЖХ. Если при изократической ВЭЖХ небольшие примеси, присутствующие в растворителе, приходят в равновесие с сорбентом и обычно не дают ложных пиков или

увеличения шумов, то в ГВЭЖХ требования к чистоте растворителей значительно более жесткие. Например, в случае обращенно-фазной ГВЭЖХ использование воды, недостаточно очищенной от органических загрязнителей, присутствующих в природной воде или привнесенных в процессе ионообменной очистки или перегонки, приводит к появлению набора интенсивных пиков, элюируемых из колонки метанольно-водным или ацетонитрильно-водным градиентом. Перегонка воды часто приводит (если аппаратура выбрана неудачно) не к уменьшению, а к увеличению количества и содержания органических загрязнителей, добавляющихся при контакте воды с недостаточно чистой аппаратурой, полимерными пробками и шлангами, смазками на органической основе и т.д. Кроме того, многие органические вещества, малолетучие сами по себе, способны легко перегоняться с водяным паром и, следовательно, загрязнять конденсат. Наиболее надежным методом очистки воды для ГВЭЖХ следует признать двукратную дистилляцию в стеклянной или кварцевой аппаратуре на шлифах, при этом на первой стадии проводится окисление примесей перманганатом калия, а на второй – обработка щелочью для удаления кислых веществ. Если после этого необходима дополнительная очистка, ее проводят пропусканием воды через колонку большого диаметра с крупным (30–100 мкм) обращенно-фазным сорбентом, используемым для препаративной работы и относительно дешевым. Хранить такую высокочистую воду желательно в темном месте в бутыли, тщательно закрытой пробкой. Вода не должна контактировать с полимерами, выделяющими в нее продукты деструкции, стабилизаторы, пластификаторы и другие загрязнители. Желательно не хранить высокочистую воду длительный срок, так как ее чистота сохраняется относительно недолго.

Другие растворители для ГВЭЖХ должны быть квалификации «для УФ-спектроскопии» или «для жидкостной хроматографии». Производство ацетонитрила и метанола, а также воды таких квалификаций освоено нашей промышленностью. При хранении, а также использовании таких растворителей всегда следует помнить о потенциальных загрязнителях и по мере возможности избегать их.

Примеси, находящиеся в метаноле или ацетонитриле, точно так же могут накапливаться на колонке и проявляться в виде пиков при градиенте. Это легко понять, если представить себе, что начальный состав растворителя органический компонент – вода 50: 50. Невымываемая таким растворителем примесь, например нафталин, может быть добавлена как в воду, так и в метанол и будет накапливаться в начале колонки одинаково независимо от компонента системы растворителей, ее содержащего (метанола или воды). Если спустя какое-то время начать градиентное элюирование, нафталин при более сильном растворителе начнет двигаться и выйдет в виде узкого пика.

Наиболее жесткие требования предъявляют к растворителю если градиент осуществляется с детектированием при длинах волн ниже 220 или 210 нм, так как в этом случае поглощают и проявляются в виде пиков многие примеси, УФ-прозрачные при 254 или 280 нм.

Единственным путем установления пригодности растворителей для ГВЭЖХ служит проверка в реальных хроматографических условиях с градиентом требуемого состава, но без введения пробы вещества (холостой градиент). Как правило, проверку проводят сначала на более грубых шкалах детектора и при длинах волн 254 или 280 нм, а при получении положительного результата переходят на более чувствительные шкалы и длины волн 220 нм и ниже. Если работа по ГВЭЖХ прервана на относительно большой срок (более недели) или один из растворителей (или оба) заменены на новые (даже той же квалификации и партии), всегда следует до начала работы с образцами создать холостой градиент для проверки работоспособности системы в целом.

Следует отметить, что многие добавки к растворителям, такие, как соли, кислоты, ион-парные и другие реагенты, способны заметно изменить свойства растворителей. Так, накопление полифосфатов в солях фосфорной кислоты, используемых для приготовления буферных растворов, приводит к существенному дрейфу при градиенте из-за сильного УФ-поглощения полифосфатов. В некоторых случаях удается уменьшить дрейф в градиентном режиме, если уравнять УФ-поглощение слабого и сильного

элюирующих растворов добавкой УФ-поглотителя, такого, как ацетон, к менее УФ-поглощающему раствору. Градиент тем легче осуществить, чем он меньше по диапазону, поэтому целесообразно менять растворитель по составу только в тех пределах, которые необходимы для разделения. Это позволяет повысить чувствительность, уменьшить дрейф нулевой линии и количество ложных пиков, а также ускорить как элюирование, так и возврат системы к исходным условиям для нового анализа.

Если при градиентном элюировании используют другой тип детектора, например флюориметрический, высокие требования к чистоте растворителей остаются, но меняется их направленность – не должно быть флюоресцирующих примесей. О пригодности растворителей для работы судят также, осуществляя холостой градиент.

В заключение отметим, что к градиентному элюированию следует прибегать только в тех случаях, когда его применение является единственным путем решения данной проблемы. Если проверка в градиентном режиме показала, что возможно использовать изократический вариант для интересующих. веществ, следует немедленно перейти к нему. Это всегда выгодно, даже в тех случаях, когда анализ разбивается на два изократичеоких, выполняемых на двух приборах с более сильным и более слабым растворителями. Более воспроизводимые результаты и возможность использовать более чувствительные шкалы, менее жесткие требования к качеству растворителя – это только некоторые из получаемых преимуществ.

Следует также отметить, что при работе в обращенно-фазном режиме с системой метанол – вода, вязкость которой не аддитивна, а меняется от 1 до 1,5 и затем до 0,6 Мпа•с при переходе от 100% воды к 100% метанола, колонка находится в неблагоприятных условиях, так как при постоянном расходе давление на колонку сначала возрастает в 1,5 раза, а затем падает в 2 раза к концу градиентного элюирования. Картина повторяется в процессе регенерации колонки, при возврате к слабому растворителю. Это сокращает срок службы колонки и затрудняет работу с колонками, содержащими мелкий сорбент (менее 5 мкм).

**Литература**

1. Barth H.G./J. Chromatogr. Sci, 1980, v. 18, No. 9, p. 409–429.
2. Беленький Б.Г., Мальцев В.Г. // В кн.: Прикладная хроматография. М., Наука, 1984, с. 54–64.
3. Энтелис С.Г., Евреинов В.В., Кузаев А.И. Реакционноспособные оли-гомеры. М, Химия, 1985.
4. Janca J., Kleparnik K./J. Liquid Chromatogr., 1982, v. 5, No. 2, p. 193 – 216.
5. Chamberlin T.A., Tulnstra H.E./Anal Chem., 1983, v. 55, No. 3, p. 428 – 432.
6. Shulz W.W./J. Liquid Chromatogr., 1980, v. 3, No. 7, p. 941–952.
7. Neff B.L., Overton J.R./J. Liquid Chromatogr., 1984, v. 7, No. 8, p. 1537–1544.
8. Mori S., Suzuki M./J. Liquid Chromatogr., 1984, v. 7, No. 9, p. 1841–1850.
9. Нефедов П.П. Канд. дис. Л., ИВС АН СССР, 1973. 150 с.
10. Виленчик Л. 3., Курбенин О.И., Беленький Б. Л / Высокомол. соед., 1984, т. А26, №10, с. 2223–2226.
11. Grubisic Z., Rempp R., Benoit Я./J. Polym. Sci., 1967, v. B5, No. 9, p. 753.
12. Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физико-химию растворов полимеров. М., Наука, 1978. 328 с.
13. Samay G /Ada chim. Acad. sci. Hung., 1979, v. 102, No. 2, p. 157–164.
14. Dawkins J.F./Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers. Chromatogr. Sci., 1984, v. 25, p. 53–116.
15. Kubin M./J. Liquid Chromatogr., 1984, v. 7, No. 1, p. 41–68.